

· 论 著 ·

实时定量 PCR 在血流感染病原体快速检测中的应用

范世珍, 林松青, 莫 莉

(广东省深圳市福田区中医院 518034)

摘要:目的 探讨实时定量 PCR 在血流感染病原体检测中的临床应用价值。方法 选取收治的 80 例患者共 92 份血液标本进行实时定量 PCR 检测, 同时进行血液培养, 比较两种方法的特异度和敏感度。结果 在 92 份标本当中, 两种方法共同阴性标本 66 份(71.7%), 两种方法共检测出病原体 10 种。实时定量 PCR 和血培养共同检出阳性标本 7 例, 两种方法的一致性为 79.3%。实时定量 PCR 的阴性预测值是 0.94, 敏感度是 0.64, 特异度是 0.82。其中 15 份标本实时定量 PCR 阳性而血培养阴性, 4 份标本血培养阳性而实时定量 PCR 阴性。其中 2 份标本所培养出的病原体不在实时定量 PCR 的检测范围内, 且实时定量 PCR 也不能检测光滑念珠菌。结论 实时定量 PCR 是快速检测血液感染标本的有价值方法, 但不能完全替代血培养。

关键词:血流感染; 脓毒血症; 实时定量 PCR

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)16-2278-03

Application of real-time PCR in rapid detection of bloodstream infection pathogens

FAN Shizhen, LIN Songqing, Mo Li

(Futian District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518034, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical application value of real-time PCR in the detection of bloodstream infection pathogens. **Methods** A total of 92 blood samples from 80 patients in our hospital were collected for conducting real time PCR detection and conventional blood culture. The sensitivity and specificity were compared between the two methods. **Results** Among 92 samples, 66 samples (71.7%) were negative in both assays. Ten different pathogens were detected by either blood culture system or real-time PCR or by both methods. Seven positive samples were detected by both assays. The consistence of the two methods was 79.3%. The negative predictive value of real-time PCR was 0.94, the sensitivity was 0.64 and the specificity was 0.82. Among them, 15 samples were positive in real-time PCR, while negative in blood culture system, 4 samples were positive in the blood culture, whereas were negative in the real-time PCR. The pathogens cultured in 2 samples were not in the detection range of real time PCR, moreover real time pCR could not detect *Candida glabrata*. **Conclusion** Real time PCR is a valuable method for rapidly detection the sample of bloodstream infection, but cannot completely replace the blood culture test.

Key words: bloodstream infection; sepsis; real-time PCR

血流感染常导致严重临床后果, 虽然在微生物诊断与抗微生物治疗方面已取得很多进展, 但败血症依然在住院患者感染中占有重要比例, 在医院内死亡原因中位列第三。美国每年 200 000 人罹患菌血症, 欧洲的研究表明由多重耐药菌引起的医院交叉感染事件也在增多, 西班牙的报道显示每 1 000 例住院患者中就有 16~31.2 例存在血流感染。国内的住院患者中, 血流感染也常是恶性肿瘤、血液病、脏器移植等免疫功能缺陷患者的重要死因。医院内感染中血流感染致死率高达 35%~60%, 而在重症监护病房中的患者, 血流感染致死率为 31.5%~82.4%, 平均 56%, 同时导致患者住院时间延长、住院费用增加。因此, 快速检测血液感染病原体并且早期给予抗生素治疗是改善血流感染患者预后最重要的手段。尽管临床上通过经验性给予广谱抗生素治疗, 但对于疗效甚微的患者有必要调整治疗手段。目前, 全自动的常规血液培养是诊断血流感染的金标准, 然而, 最终的培养结果往往是需要等待 12~48 h。对于营养需求苛刻的病原体(如酵母菌)可能需要更长的时间^[1]。此外, 若患者先前使用过抗生素, 血培养的阳性率一般更低。因此, 直接从血液标本中对细菌或真菌的核酸进行扩增是鉴定病原体感染的重要手段^[2-4]。本研究通过实时定量 PCR 技术检测血流感染患者中的病原体, 并与常规血培养法进行对比, 旨在评价其在临床中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究纳入的 92 份血液标本来自 2015 年 6~9 月深圳市福田区中医院 80 例患者, 其中男 39 例、女 41 例, 平均年龄(45.6±8.5)岁; 59 例患者(73.8%)来自重症医学科和呼吸内科, 21 例(26.3%)来自心血管内科和神经内科; 72 例患者(90.0%)在采集血液时已经接受过抗菌药物治疗, 19 例(23.8%)在抽血后 24 h 内死亡; 80 例患者中有 3 例具有全身炎症反应综合征。

1.2 方法 使用静脉穿刺术获取的血液标本同时进行常规血培养法和 LightCycler SeptiFast (SF) 实验。常规血培养法: 收集 20 mL 血液接种到 BacT/Alert FAN 需氧或厌氧瓶中, 并在 BacT/Alert 3D 自动血液培养系统 (Bio-Merieux) 37 °C 培养 1~5 d, 当所有瓶子为阳性时, 根据相应方法分离并鉴定微生物。静脉穿刺得到的 5 mL 含有乙二胺四乙酸(EDTA)血液同时也进行血培养法检测, 其步骤根据 SeptiFast Lys、SeptiFast Prep 和 LightCycler SeptiFast 试剂盒说明书进行。PCR 在 LightCycler 2.0 (Roche) 仪器上进行。所有检测微生物通过 SeptiFast 识别软件识别特有的峰值, 并人工计算其 T_m 值, 当对照为阳性且无其他信号时, SF 结果报告为阴性。对于某些 SF 检测葡萄球菌和链球菌凝固酶阴性时, 可能是层流污染所致, 若其临界值以及 CP 值高于 35 循环也纳入软件分析。

1.3 统计学处理 利用 SPSS 15.0 软件进行分析。并计算灵敏度、特异度、阴性预测值。

2 结 果

2.1 两种方法细菌检出率情况 在 92 例血液标本中,两种方法均检测阴性 66 例,阳性 7 例。4 例标本血培养阳性而实时定量 PCR 阴性。15 例标本血培养阴性而实时定量 PCR 阳性。实时定量 PCR 与血培养的阴性预测值是 0.94,敏感度是 0.64,特异度是 0.82。在 15 例实时定量 PCR 阳性而血培养阴性的标本中,包括埃希菌属 5 例,肠球菌属 4 例,肠杆菌属 3 例,假单胞菌 2 例,金黄色葡萄球菌 1 例。见表 1。

表 1 实时定量 PCR 与血培养细菌检出情况比较(n)

血培养	实时定量 PCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	7	4	11
阴性	15	66	81
合计	22	70	92

2.2 实时定量 PCR 假阴性情况 实时定量 PCR 的假阴性率为 4.3%(4/92),包括多杀性巴氏杆菌 1 例,解链食子酸链球菌 1 例,该 2 种病原体为包含在预先设的实时定量 PCR 扩增方案当中。此外,实时定量 PCR 也不能检测光滑念珠菌。

3 讨 论

血培养为检测血中病原微生物的经典方法,目前仍为血流感染病原微生物分离鉴定的金标准。尽管如此,血培养也存在一些由方法本身特点决定的不足,制约了其检测的速度与敏感性。首先,细菌分裂繁殖到能够检测到的水平需要一定的时间,这个速度与细菌种属有关,有些种属的细菌生长缓慢,苛养菌甚至不生长,使得血培养在细菌鉴定中速度缓慢而且敏感性差。尤其检测新生儿血流感染时敏感性更差,这是由于新生儿血培养时用于检测的血量少,而且血液中菌量低所致。其次,血培养中令人困扰的问题是进行抗生素治疗后血培养阳性率明显下降,血培养只能检测到存活的微生物,而抗生素治疗后会杀死细菌使其检出率降低。上述因素显著降低了血培养在血流感染诊断中的速度与敏感性,因此临床工作迫切要求能够快速、准确鉴定血流感染中病原微生物的敏感方法,及时、有效地控制感染,降低患者病死率。

本研究对血培养与实时定量 PCR 检测血流感染中的病原微生物进行了比较。先前的研究表明,在血液科、肿瘤科以及重症医学科等科室,实时定量 PCR 的敏感度范围为 0.60~0.95,特异度为 0.74~0.93。相比之下,本研究的敏感性相对较低,但特异性更高。本研究当中,实时定量 PCR 阳性,而血培养阴性标本占 16.3%,而国外同类研究显示其检出率仅为 10%,但 Lucignano 等^[5]的研究却显示其检出率为 36.3%。当在人体其他部位也检测出相应的病原体时,实时定量 PCR 阳性,而血培养阴性标本在一定程度上反映出真实的结果。然而,15 例患者中 5 例出现阳性,但血培养阴性的标本,同样的病原体在 10 d 前也可检测到。然而这是否是由于使用了抗生素导致其无法生长,还是仅仅是血液中存在这些病原体的 DNA,目前依然不清楚。血液中的细菌 DNA 与全身炎症反应综合征的发生以及脓毒症之间是否存在关联,目前依然存在争议。有研究发现血液中游离 DNA 的出现是评价 ICU 患者发生多器官功能衰竭的危险因素,因此,实时定量 PCR 不但可以用于未知病原体或其 DNA 的检测,同时也能为

临床提供有价值的信息,而这些是常规血培养难以做到的^[6]。

本研究中,实时定量 PCR 的假阴性为 4.3%,国外有报道为 4.8%,但这些研究未考虑到未列入实时定量 PCR 扩增谱中的其他细菌。同时,对真菌的检测也是本方法存在的重要难题。实时定量 PCR 检测光滑念珠菌失败的原因可能是 PCR 反应的抑制或自我扩增效率低下,这可能与扩增该菌时选取的 ITS 区域过大所致^[7-9]。

尽管如此,本研究也存在一些局限性。首先,由于国内外已经开展过类似的研究,因此本文的创新性也受到一定的影响;其次,纳入研究的标本数量较少(周期仅仅 3 个月),因此还有必要进一步增加样本量,从而更加准确地比较实时定量 PCR 和血培养各自的特异性与敏感性。总之,实时定量 PCR 可快速、敏感地检测血流感染病原体,即便曾使用过抗生素,实时定量 PCR 也是一个非常有价值的检测方法^[10]。然而,实时定量 PCR 无法获取细菌耐药方面的数据,且检测的病原体数量有限,因此它也不能完全替代常规细菌培养^[11]。但两者结合,能为临床提供快速的治疗方案,最终减少耐药菌的产生而利于患者康复^[12]。

参考文献

- [1] Peters RP, Van Agtmael MA, Danner SA, et al. New developments in the diagnosis of bloodstream infections[J]. Lancet Infect Dis, 2004, 4(12): 751-760.
- [2] Chaidaroglou A, Manoli E, Marathias E, et al. Use of a multiplex polymerase chain reaction system for enhanced bloodstream pathogen detection in thoracic transplantation[J]. J Heart Lung Transplant, 2013, 32(7): 707-713.
- [3] Somogyvari F, Horvath A, Serly J, et al. Detection of invasive fungal pathogens by real-time PCR and high-resolution melting analysis[J]. In Vivo, 2012, 26(6): 979-983.
- [4] Hansen WL, Beuving J, Bruggeman CA, et al. Molecular probes for diagnosis of clinically relevant bacterial infections in blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(12): 4432-4438.
- [5] Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, et al. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(6): 2252-2258.
- [6] Maubon D, Hamidfar-Roy R, Courby S, et al. Therapeutic impact and diagnostic performance of multiplex PCR in patients with malignancies and suspected sepsis[J]. J Infect, 2010, 61(4): 335-342.
- [7] Chen SC, Kontoyiannis DP. New molecular and surrogate biomarker-based tests in the diagnosis of bacterial and fungal infection in febrile neutropenic patients[J]. Curr Opin Infect Dis, 2010, 23(6): 567-577.
- [8] Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples[J]. Med Microbiol Immunol, 2008, 197(3): 313-324.
- [9] Obara H, Aikawa N, Hasegawa N, et al. The role of a real-time PCR technology for rapid detection and identification of bacterial and fungal pathogens(下转第 2282 页)

续表 2 5 年间常见革兰阴性多重耐药菌对常见抗菌药物的耐药情况 (%)

抗菌药物	大肠杆菌		肺炎克雷伯菌		鲍曼不动杆菌		铜绿假单胞菌	
	S	R	S	R	S	R	S	R
庆大霉素	22.22	77.88	33.33	66.67	3.13	96.88	26.67	73.33
妥布霉素	59.26	40.74	38.10	61.90	0.46	99.54	20.00	80.00
哌拉西林/他唑巴坦	96.30	3.70	61.90	38.10	6.25	93.75	33.33	66.67
氨基糖苷	37.04	2.96	9.52	90.48	—	—	—	—
头孢唑啉	0.76	99.24	0.65	99.35	—	—	—	—
头孢他啶	48.15	51.85	38.10	61.90	6.25	93.75	26.67	73.33
头孢曲松	3.70	96.30	2.44	97.56	0.88	99.12	—	—
复方磺胺甲噁唑	37.04	62.96	33.33	66.67	18.75	81.25	—	—
氨基糖苷/舒巴坦	11.11	88.89	4.76	95.24	1.75	98.25	—	—
厄他培南	96.30	3.70	71.43	28.57	—	—	—	—

注：—表示无数据。

3 讨 论

从本院临床多重耐药菌流行病学特点及耐药性研究结果表明,本院产生多重耐药机制的菌种已经有 37 种,总检出率为 37.41%,其中以大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌为主,阳性率最高的细菌已经达到 58.21%,与 Mohnarin 的研究数据接近^[7]。在各种标本的分布上,痰液、中段尿、血液、分泌物、脓液的阳性率最高,导管头、耳分泌物中分离阳性率较低。在病区之间的分布情况,ICU、呼吸科、外科最高,脾胃科、乳腺科和五官科最低,其主要原因是较高阳性率的科室为重症患者,抵抗力较弱,均有长期住院的经历,与刘彩林等^[8]对血培养及耐药分析中的流行病学特征相符。从多重耐药菌对临床常用抗菌药物的耐药性可以看出,其耐药机制是十分复杂和多样的。欧阳范献等^[9]对 MRSA 全基因结构及 SCCmec 分型的分析清晰地描述了 MRSA 的耐药基因结构,对含酶抑制剂的复合抗菌药物在长期使用后,也出现了逐年上升的耐药现象,并且已经成为临床感染性疾病治疗的一个棘手问题,也成为医院感染控制的重点。对此,笔者认为应从 3 个方面对多重耐药菌加以控制:首先,应该加强抗菌药物的管理,依据药敏试验结果合理用药,延缓耐药基因的产生。其次,要加强抗菌机制的基础研究,加强中药抗菌活性的研究,从各个方向去思考开发出新的抗菌药物。再次,严格控制多重耐药菌的传播,对分离出多重耐药菌的患者要注意隔离,对出现多重耐药菌株较多的病区加强消毒,对出现多重耐药菌感染的疾病要用不同手段加以综合治疗。从目前抗菌药物的耐药情况看,抗菌药物的不合理使用已经非常广泛,应该引起卫生行政部门的高度重视,改变目前抗菌药物的大量、不依据药敏结果随意用药的现象。

参考文献

[1] 欧阳范献,陈允凤. 四年中海口地区产超广谱 β-内酰胺酶

(上接第 2279 页)

in whole-blood samples[J]. J Infect Chemother, 2011, 17 (3):327-333.

[10] Wallet F, Nseir S, Baumann L, et al. Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(6):774-779.

[11] Peng JS, Liu ZH, Li CJ, et al. Development of a real-time

阳性菌检测及其耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(1):89-92.

[2] 张广慧,曹雪萍. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌临床分离株的流行病学与耐药机制研究[J]. 检验医学, 2015, 30(1):53-57.

[3] Lyon DJ, Scheel O, Adeyemi-Doro FA, et al. Antimicrobial susceptibility and extended-spectrum beta-lactamases of Hong Kong isolates of enterobacteriaceae[J]. Scand J Infect Dis Suppl, 1996, 101(3):17-20.

[4] 黄家祥,叶书来. 临床分离的 2208 株病原体分布及耐药性[J]. 中国感染控制杂志, 2014, 13(1):36-39.

[5] 王辉,郭萍,孙宏莉. 碳青霉烯类耐药的不动杆菌分子流行病学及其泛耐药的分子机制[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 12(29):1066-1073.

[6] 钟爱玉,戴莹,方咏梅. 综合干预措施降低多重耐药菌感染研究[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(4):287-289, 292.

[7] Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, et al. Nosocomial bloodstream infections due to Acinetobacter baumannii, Acinetobacter pittii and Acinetobacter nosocomialis in the United States[J]. J Infect, 2012, 64(3):282-290.

[8] 刘彩林,孙自镛,朱旭慧,等. 2001~2010 年血培养病原菌变迁及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(3):624-626.

[9] 欧阳范献,鲍时翔. MRSA 全基因结构及 SCCmec 分型的意义[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(12):1118-1121.

(收稿日期:2016-03-22 修回日期:2016-06-15)

PCR method for the detection of bacterial colonization in rat models of severe acute pancreatitis[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(3):326-331.

[12] Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria[J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 30(Suppl 1):S7-S15.

(收稿日期:2016-03-29 修回日期:2016-06-20)